Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. M. Eggstein

DIE BEEINFLUSSUNG DER PLASMATISCHEN GERINNUNG IN VITRO DURCH ENDOTOXIN VORBEHANDELTE MENSCHLICHE LEUKOZYTEN.

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HANS - JOACHIM SCHMID
aus Tübingen

1978

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. M. Eggstein

DIE BEEINFLUSSUNG DER PLASMATISCHEN GERINNUNG IN VITRO DURCH ENDOTOXIN VORBEHANDELTE MENSCHLICHE LEUKOZYTEN.

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HANS - JOACHIM SCHMID
aus Tübingen

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.– E. Hoffmeister

Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. E. Hiller
(Professor Dr. H.D. Waller)

---

gedruckt bei H.- J. Köhler, Reprografischer Betrieb , Tübingen

Für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit möchte ich

Herrn Dr. Erhard Hiller

besonders danken.

Ebenfalls sehr zu Dank für die Hilfe bei der praktischen Durchführung meiner Untersuchungen bin ich

Frau Brigitte Croll

verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	2
1.1.	Historischer Überblick	2
1.2.	Das System der plasmatischen Gerinnung	4
1.3.	Zielsetzung	7
2.	Methoden und Materialien	9
2.1.	Leukozytenanreicherung	9
2.1.1.	Blutentnahme	9
2.1.2.	Anreicherung der Leukozyten	9
2.2.	Inkubation der isolierten Leukozyten	10
2.3.	Beschreibung der einzelnen Gerinnungsuntersuchungen	12
2.3.1.	Rekalzifizierungszeit	12
2.3.2.	APTT (Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit)	13
2.3.3.	TEG (Thrombelastographie)	14
2.3.4.	Prothrombinverbrauchstest	14
2.3.5.	Prothrombinzeit nach QUICK	15
2.3.6.	Zweistufentest nach NEMERSON	15
2.3.7.	Untersuchungen mit Mangelplasmen	17
2.4.	Materialien und Geräte	18
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Rekalzifizierungszeit	21
3.2.	APTT	23
3.3.	TEG	24
3.4.	Prothrombinverbrauchstest	26
3.5.	Prothrombinzeit nach QUICK	27
3.6.	Zweistufentest nach NEMERSON	28
3.7.	Untersuchungen mit Mangelplasmen	30
4.	Diskussion	34
5.	Zusammenfassung	38
6.	Literaturnachweis	39

1. Einleitung

1.1. Historischer Überblick

Aufgrund verschiedener klinischer Beobachtungen wurde schon seit langem die Möglichkeit der Beeinflussung der Blutgerinnung durch Leukozyten diskutiert und entsprechende tierexperimentelle und in vitro Versuche dazu angestellt.

So wurden von MARTIN und ROKA (1951) aus Blut von Leukämiepatienten myeloische und lymphatische Zellen auf ihre gerinnungshemmenden bzw. gerinnungsfördernden Wirkungen untersucht. Als Testsystem für die gerinnungsfördernden Wirkungen diente die Veränderung der Rekalzifizierungs- und Prothrombinzeit nach Zugabe von Leukozyten. Dabei ergab sich, daß von leukämischen Leukozyten die myeloischen eine Verlängerung, die lymphatischen eine Verkürzung der Rekalzifizierungs- und Prothrombinzeit bewirkten. Leukozyten aus Normalblut verkürzten die Prothrombinzeit in niedrigeren Konzentrationen und verlängerten sie in hohen Konzentrationen.

RAPAPORT und HJORT (1967) beschrieben eine relativ schwache gerinnungsfördernde Aktivität in Leukozyten, die sie aus dem Peritonealexsudat von Kaninchen gewonnen hatten.

SABA et al. (1973) fanden nach Zugabe von intakten und homogenisierten Kaninchenleukozyten zum Testansatz verschiedener Gerinnungsteste eine Verkürzung der Gerinnungszeiten.

Homogenisierte menschliche Leukozyten verlängerten die Gerinnungszeiten, während intakte Leukozyten ebenfalls zu einer Verkürzung führten.

NIEMETZ (1972) und NIEMETZ und FANI (1973) fanden nach zweimaliger Endotoxinvorbehandlung von Kaninchen eine Zunahme der gerinnungsfördernden Aktivität von Leukozyten aus dem Peritonelexsudat.

Verschiedene andere Untersucher (KOCIBA et al., 1973; KOCIBA et al., 1972; LERNER et al., 1971); SABA et al., 1973; ZACHARSKI und McINTYRE,1973) beobachteten ebenfalls eine Zunahme der gerinnungsfördernden Aktivität, wenn sie die auf verschiedene Weise gewonnenen Leukozyten in einem Kulturmedium bei 37° C inkubierten. Durch die Zugabe von Endotoxin zum Kulturmedium konnte die gerinnungsfördernde Aktivität noch wesentlich gesteigert werden. (GARG und NIEMETZ, 1973; HILLER et al., 1976; LERNER et al., 1971; NIEMETZ, 1972).

Während die bisher genannten Arbeitsgruppen im wesentlichen die gerinnungsfördernden Wirkungen der Leukozyten untersuchten, befaßten sich ASTRUP (1967) und GANS (1963) mit den fibrinolytischen Wirkungen der Leukozyten.

In einer Reihe von tierexperimentellen Arbeiten (HORN und COLLINS, 1968; KOCIBA und GRIESEMER, 1972; LISIEWICZ et al., 1973; McKAY et al., 1967; NIEMETZ und FANI,1971; NIEMETZ und FANI, 1973) wurde der Frage nachgegangen, ob Leukozyten bei der Entstehung von Thromben eine Rolle spielten. Die Injektion von Leukozyten, die in einem Kulturmedium über einige Stunden inkubiert wurden, führten bei Versuchstieren zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit Thrombusbildung

in verschiedenen Organen (KOCIBA und GRIESEMER, 1972; LISIEWICZ et al., 1973; NIEMETZ und FANI, 1973).

Auch die generalisierte Shwartzman-Sanarelli-Reaktion wird in Zusammenhang mit der gerinnungsfördernden Wirkung von Leukozyten gebracht. So stellten LERNER et al. (1968) fest, daß die durch Endotoxin-Injektion hervorgerufene intravasale Gerinnung nur in Gegenwart von Leukozyten zustandekommen kann. Bei Versuchstieren, die mit Stickstofflost leukopenisch gemacht wurden, konnte durch Endotoxin keine intravasale Gerinnung hervorgerufen werden (HORN und COLLINS, 1968; LERNER et al., 1968; LISIEWICZ et al., 1973; McKAY et al., 1967; MÜLLER-BERGHAUS und ECKHARDT, 1975; MÜLLER-BERGHAUS et al., 1976; NIEMETZ und FANI, 1971).

1.2. Das System der plasmatischen Gerinnung

Unter dem Begriff der Blutgerinnung versteht man die durch Thrombin enzymatisch gesteuerte Umwandlung von im Plasma gelöstem Fibrinogen in Fibrinmonomere, die unter dem Einfluß des fibrinstabilisierenden Faktors XIII zu Fibrinpolymeren werden. Durch Quervernetzung dieser Fibrinpolymere entsteht dann das Fibringerinnsel.

Die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin stellt den letzten Schritt einer Kettenreaktion verschiedener Gerinnungsfaktoren dar. Entsprechend den heute gültigen Vorstellungen über den

Ablauf der Blutgerinnung kann diese Kettenreaktion sowohl durch ein endogenes als auch ein exogenes System in Gang gesetzt werden.

Im endogenen System der Gerinnung wird die Aktivierung nur von im Plasma vorhandenen Gerinnungsfaktoren ausgelöst. Hierbei wird der Faktor XII durch den Kontakt mit einer unphysiologischen Oberfläche (z. B. Kollagen) in den aktivierten Faktor XII_a umgewandelt. Ein Komplex des Faktors XII_a mit Faktor XI aktiviert nun den Faktor IX. Der aktivierte Faktor IX_a überführt in Gegenwart von Faktor VIII und ionisiertem Calcium (Ca^{++}) den inaktivierten Faktor X in seine aktive Form Faktor X_a. Unter Einwirkung des aktivierten Faktors X_a, des Faktors V, eines Phosopholipoids und Ca^{++} wird Prothrombin zu Thrombin umgewandelt (s. Abb. 1). Thrombin bewirkt nun durch proteolytische Abspaltung die Entstehung von Fibrinmonomeren aus Fibrinogen.

Das exogene System der Gerinnung wird nicht durch einen plasmaeigenen Faktor sondern durch einen von außerhalb des Plasmas stammenden Gewebsfaktor aktiviert. Der Gewebsfaktor, auch Gewebsthromboplastin genannt, wird bei Gewebsschädigung freigesetzt und kommt dann mit dem bei einer Verletzung austretenden Blut in Berührung. Dies führt zur Aktivierung von Plasmafaktor VII. Ein Komplex aus aktiviertem Faktor VII_a, Phospholipoid und Ca^{++} aktiviert den Faktor X zu Faktor X_a. Von nun an läuft der Gerinnungsvorgang wie beim endogenen System weiter (s. Abb. 1).

Die gerinnungsfördernde Wirkung von Leukozyten wurde aufgrund der bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse mit dem exogenen System der Gerinnung in Verbindung gebracht. Es wurde postuliert, daß Leukozyten eine Substanz enthalten, welcher der Wirkung des Gewebsthromboplastins entspricht (GARG und NIEMETZ 1973; KOCIBA et al., 1972; LERNER et al., 1971; NIEMETZ, 1972). Dies würde heißen, daß es bei der Zugabe von Leukozyten zur Aktivierung des exogenen Gerinnungssystems kommt.

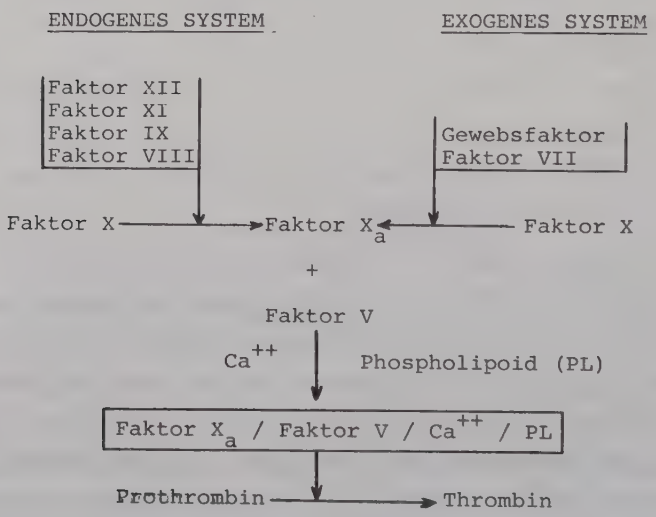


Abb. 1 Schema über den Ablauf der Blutgerinnung nach den heute gültigen Vorstellungen.

1.3. Zielsetzung

Eigene Voruntersuchungen mit menschlichen, nicht kultivierten und Endotoxin stimulierten Leukozyten hatten ergeben, daß die plasmatischen Gerinnungssysteme durch dieselben sehr unterschiedlich beeinflußt wurden. So führte in der Mehrzahl der Fälle der Zusatz von Leukozyten zum Testansatz verschiedener Globaltests zu einer Gerinnungshemmung, wenngleich in einigen Experimenten auch eine schwache gerinnungsfördernde Wirkung nachweisbar war.

Von tierexperimentellen Untersuchungen ist bekannt, daß Leukozyten von Endotoxin-vorbehandelten Tieren bei der Auslösung der generalisierten Shartzman-Sanarelli-Reaktion von entscheidender Bedeutung sind (HORN und COLLINS, 1968; LERNER et al., 1968; NIEMETZ und FANI, 1971). Leukozyten solcher vorbehandelter Tiere wiesen im Gegensatz zu Leukozyten von nicht behandelten Tieren eine wesentlich stärkere gerinnungsaktivierende Wirkung auf.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob von menschlichen Leukozyten, die in einem Kulturmedium inkubiert und mit Endotoxin vorbehandelt wurden, eine ebenso starke Beeinflussung der plasmatischen Gerinnung ausging, wie dies tierexperimentell gezeigt worden war. Ebenfalls war von Interesse, in welcher Weise das plasmatische Gerinnungssystem beeinflußt würde.

Von der Klinik ist bekannt, daß die gramnegative Sepsis mit Endotoxinämie fast regelmäßig zu einer als disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) bezeichneten schweren Gerinnungsstörung führt. Vieles über diese lebensbedrohliche Gerinnungsstörung ist noch unbekannt. Die vorliegenden Untersuchungen sollten somit auch zur Klärung der Frage beitragen, welche Rolle Endotoxin-stimulierten Leukozyten bei der Auslösung der DIC spielten.

2. Methoden und Materialien

2.1. Leukozytenanreicherung

Die Methode der Leukozytenanreicherung wurde im wesentlichen von BØYUM (1964, 1968) übernommen. Sie beruht auf der Sedimentierung von Erythrozyten in Citratvollblut mit einer Dextran-Ronpacon^{R}-Lösung. Die Leukozyten bleiben angereichert im Überstand suspendiert.

2.1.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgt mittels einer Blutentnahmekanüle in sterile Kunststoffröhrchen, die 1,5 ml 3,8%iges Natriumcitrat enthalten. Nach Punktion einer Armvene läßt man das Röhrchen bis zur 15 ml Marke vollaufen. Danach wird das Röhrchen mit einem sterilen Schraubverschluß verschlossen und zur Durchmischung ein- bis zweimal gekippt. Für eine Anreicherung benötigt man mindestens 30 ml Citratblut. Um die Leukozytenzahl und das weiße Differentialblutbild bestimmen zu können, nimmt man zusätzlich noch Blut in ein Blutbildröhrchen ab.

2. 1. 2. Anreicherung der Leukozyten

In sterile Kunststoffröhrchen werden 3-4 ml Ronpacon^{R}-Dextran-Lösung gegeben. Die Lösung wird vorsichtig mit Hilfe steriler Kunststoffpipetten mit etwa 10 ml Citratblut

überschichtet. Anschließend läßt man die Erythrozyten bei Raumtemperatur sedimentieren. Dieser Vorgang nimmt etwa 1-2 Stunden in Anspruch. Danach wird der gelbliche, leukozytenreiche Überstand mit einer Kunststoffpipette abgehoben und 5 Min. lang mit einer Tischzentrifuge mit 1500-2000 Rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem man den Überstand verworfen hat, suspendiert man die gewonnenen Leukozyten in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die jetzt noch vorhandenen Erythrozyten werden durch hypotone Hämolyse entfernt. Dazu gibt man zu der Zellsuspension die dreifache Menge sterilen destillierten Wassers. Dieses läßt man 30 Sek. einwirken, dann gibt man die einfache Menge 3,6%iger Kochsalzlösung dazu, um so die Zellsuspension wieder isoton zu machen. Die so von Erythrozyten gereinigte Leukozytensuspension wird nun gewaschen und zwar zweimal mit einem Citrat-Phosphat-Albumin-Puffer und zweimal mit Kulturmedium. Im Anschluß an jeden Waschvorgang wird die Zellsuspension jeweils 5 Min. lang mit 1500 Rpm zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen werden die Leukozyten in 1-2 ml Kulturmedium suspendiert und dann in der Zählkammer nach NEUBAUER gezählt. Die Thrombozytenverunreinigung lag zwischen 5000 und 20 000 Thrombozyten / mm^3 bei einer Zellzahl von 20 000 Leukozyten / mm^3.

2.2. Inkubation der isolierten Leukozyten

Die Inkubation der Leukozyten in einem Kulturmedium in Gegenwart von Endotoxin soll eine Verstärkung der gerinnungsfördernden Aktivität bewirken.

Zur Inkubation werden die Leukozyten unmittelbar im Anschluß an die Anreicherung mit Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von etwa 6000 Zellen / mm^3 eingestellt. Die Suspension wird unter sterilen Bedingungen in Portionen zu je 20 ml in Gewebekulturflaschen abgefüllt. Die Zellen werden dann 20 Stunden lang bei 37° C inkubiert. Der Hälfte der Zellen wird Endotoxin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben.

Nach Beendigung der Inkubation werden die Leukozyten vorsichtig aufgeschüttelt und zum Zentrifugieren in sterile Kunststoffröhrchen gefüllt. Dann wird 5 Min. lang bei 1500 Rpm zentrifugiert. Das überstehende Kulturmedium wird verworfen. Anschließend werden die Zellen gezählt und nach der von RABINOWITZ (1964) beschriebenen Methode auf ihre Unversehrtheit untersucht. Dazu wird eine kleine Menge der Leukozytensuspension, etwa 25 µl entnommen und mit der 10-fachen Menge einer 0,25%igen Trypanblaulösung vermischt. Nach einer Einwirkdauer von 10 Min. werden die Zellen aufgeschüttelt und in eine Zählkammer gegeben. Bei 360-facher Vergrößerung erkennt man, daß sich die verletzten und abgestorbenen Zellen blau angefärbt haben, während die intakten Zellen ungefärbt geblieben sind. Es wird das Verhältnis der intakten Zellen zu den zerstörten Zellen ermittelt, wobei man mindestens 200 Zellen auszählt. Im Durchschnitt sind die Zellen zu 60-95 % unversehrt. Dabei unterschieden sich die mit Endotoxin inkubierten Leukozyten in ihrer Unversehrtheit nicht wesentlich von den Leukozyten, die ohne Endotoxin inkubiert worden waren.

2.3. Beschreibung der einzelnen Gerinnungsversuche

Die untersuchten Leukozyten stammen aus einem Pool von 20 Leukozytenanreicherungen. Die eine Hälfte des Pools besteht aus Leukozyten, die mit Endotoxin inkubiert wurden, die andere Hälfte aus Leukozyten, die ohne Endotoxin inkubiert wurden.

Unmittelbar vor der Verwendung werden die in kleinen Portionen eingefrorenen Leukozyten aufgetaut und unter Kühlung mit Ultraschall (Branson Sonifier) 10 Sek. lang bei 50 Watt homogenisiert.

Dann werden mit physiologischer Kochsalzlösung Verdünnungen von 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 hergestellt. Bei einer eingestellten Ausgangskonzentration von 20 000 Leukozyten/mm^3 finden also folgende Leukozytenkonzentrationen Verwendung: 20 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250 und 625 Leukozyten/mm^3. Die in den nachfolgenden Versuchsbeschreibungen angegebenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die Leukozytenkonzentration im Leukozytenzusatz.

Während der einzelnen Versuche werden die Leukozyten bis zu ihrer Verwendung auf Eis gekühlt.

2.3.1. Rekalzifizierungszeit

Es handelt sich bei der Rekalzifizierungszeit um eine mit Celit (Fa. Roth, Karlsruhe) kontaktaktivierte Plasmagerinnungszeit.

Testansatz :

0,1 ml identisches thrombozytenarmes Plasma und
0,1 ml Zellysat (mit 20 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250 und 625 Leukozyten / mm^3, bzw. physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle) werden in ein Fiolaxröhrchen mit Celit gegeben und unter kräftigem Schütteln mit einem Schüttelgerät 2 Min. lang bei 37° C im Wasserbad zur Aktivierung inkubiert. Dann gibt man
0,1 ml 0,025 mol $CaCl_2$-Lösung dazu und setzt gleichzeitig die Stoppuhr in Gang. Die Zeit bis zum sichtbaren Gerinnungseintritt, den man an der Verklumpung der Celit-Partikel erkennt, wird registriert.

2.3.2. APTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit)

Testansatz :

0,1 ml identisches, thrombozytenarmes Plasma,
0,1 ml Zellysat mit den o. g. Zellkonzentrationen, bzw. physiologische Kochsalzlösung und
0,1 ml Cephaloplastin^R (Fa. Merz und Dade, München) werden in ein durchsichtiges Kunststoffröhrchen gegeben und 2 Min. lang bei 37° C inkubiert. dann gibt man
0,1 ml 0,025 mol $CaCl_2$-Lösung dazu und mißt die Zeit bis zum Gerinnungseintritt.

2.3.3. TEG (Thrombelastographie)

Testansatz :

0,3 ml identisches Vollblut werden sofort nach der Blutentnahme zusammen mit

0,05 ml Zellysat in eine TEG-Küvette gegeben und in den Thrombelastographen (Fa. Hellige, Freiburg) eingesetzt. Das TEG wird 2 Stunden lang registriert. Zur Auswertung werden folgende Meßgrössen festgehalten: a) die Reaktionszeit (r) in Minuten, b) die Gerinnselbildungszeit (k) in Minuten, c) die maximale Amplitude (m_a) in mm und d) die maximale Thrombuselastizität (M_E), die sich nach der Formel $m_E = 100 \times a / 100 - a$ berechnen läßt.

2.3.4. Prothrombinverbrauchstest

Testansatz :

0,2 ml Zellysat, bzw. physiologische Kochsalzlösung werden in

2,0 ml identisches Vollblut gegeben. Dieses läßt man 1 Stunde lang bei 37° C im Wasserbad gerinnen. Anschließend wird das Gerinnsel mit einem Holzstäbchen vom Rand abgelöst. Das Serum wird 2 Minuten lang mit 2 000 Rpm zentrifugiert. Dann gibt man zu

0,1 ml adsorbiertem Kaninchenplasma (Merz und Dade, München) (enthält Faktor I und V)

0,2 ml Calcium-Thromboplastin. (Behring, Marburg).

Dann gibt man

0,1 ml vom obigen Serum dazu. Gleichzeitig wird die Stoppuhr in Gang gesetzt und die Gerinnungszeit bestimmt.

2.3.5. Prothrombinzeit nach QUICK

Testansatz :

0,1 ml identisches, thrombozytenarmes Plasma wird mit
0,1 ml Zellysat, bzw. physiologischer Kochsalzlösung 30 Sek. lang im Koagulometer n. SCHNITGER und GROSS vorgewärmt. Dann gibt man
0,2 ml ebenfalls vorgewärmtes Calcium-Thromboplastin (Fa. Behring, Marburg) dazu. Der Gerinnungseintritt wird automatisch vom Koagulometer ermittelt.

2.3.6. Zweistufentest nach NEMERSON (s. Abb. 2)

Der Zweistufentest dient zur spezifischen Erfassung von Gewebsthrombokinase-Aktivität.

Testansatz :

1. Stufe 0,1 ml Zellysat, bzw. physiologische Kochsalzlösung wird mit
0,1 ml Faktor-VII/X-Konzentrat (Konyne^{R}, Fa. Travenol, München) 5 Min. lang bei 37^{o} C im Wasserbad inkubiert.

Dann gibt man zu dieser Mischung

0,05 ml 0,025 mol. $CaCl_2$-Lösung. Nach 1 Min. gibt man zu

0,1 ml des obigen Ansatzes

0,4 ml 0,015 mol. Natriumcitratlösung.

2. Stufe 0,1 ml der vorhergehenden Mischung,

0,1 ml identisches, thrombozytenarmes Plasma und

0,1 ml Phospholipoide (Inosthin, Associated Concentrates, Woodside, L. J., USA) werden zusammen 15 Sek. lang inkubiert. Dann gibt man

0,1 ml 0,025 mol. $CaCl_2$-Lösung dazu. Gleichzeitig wird die Stoppuhr in Gang gesetzt und die Gerinnungszeit ermittelt.

Zu allen Reaktionsschritten benützt man neue Kunststoffröhrchen. Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Zellysats und des Plasmas werden vorgewärmt.

Reaktionsschema zum Zweistufentest nach NEMERSON

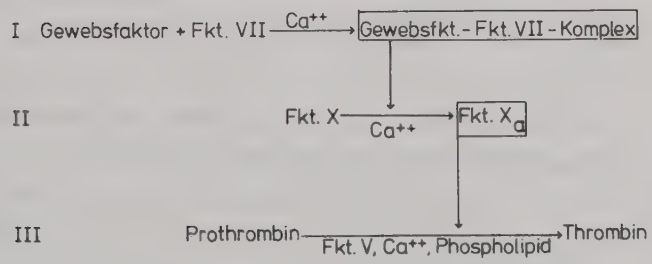


Abb. 2

2.3.7. Untersuchungen mit Mangelplasmen

Untersucht werden soll die Wirkung von Leukozyten auf verschiedene Mangelplasmen.

Testansatz :

0,1 ml des jeweiligen Mangelplasmas,
0,1 ml Zellysat, bzw. physiologische Kochsalzlösung und
0,1 ml Cephaloplastin^{R} werden 2 Min. lang bei 37^{o} C in durchsichtigen Kunststoffröhrchen im Wasserbad inkubiert.

Dann gibt man

0,1 ml 0,025 mol. $CaCl_2$ Lösung dazu. Gleichzeitig wird die Stoppuhr in Gang gesetzt und die Gerinnungszeit ermittelt.

Es werden komerziell erhältliche Faktor-V-, VII/X-, (Fa. La Roche, Grenzach) -VIII-, -IX-, -XI- und -XII- (Fa. Merz und Dade, München) Mangelplasma untersucht.

2.4. Materialien und Geräte

a) Blutentnahme

Blutentnahmekanülen.
Sterile Kunststoffröhrchen, 15 ml, mit Schraubverschluß.
(Fa. BECTON, DICKINSON GmbH, Heidelberg, Best. Nr. 2095)
Natriumcitrat, 3,8%ig, nach WESTERGREN.

b) Leukozytenanreicherung :

Ronpacon-Dextran-Lösung :
Ronpacon "Cilag", 75%ig. (Cilag Chemie GmbH 6146 Alsbach).
Dextran 500. (Pharmacia, Schweden).
Ampuwa^R (aqua dest., steril).
Vorschrift zur Herstellung der Lösung :

1. Eine Ampulle Ronpacon 75%, (20 ml), wird mit Ampuwa auf 45,73 ml verdünnt. Dabei ergeben sich folgende Werte: Konzentration :32,8%; Dichte : 1,200 $\pm$ 0,001 g/ml. pH : 7,3 $\pm$ 0,3.

2. 4, 02 g Dextran 500 werden mit Ampuwa auf 67 ml aufgefüllt. Es ergibt sich eine 6%ige Lösung.
3. Die 67 ml 6%ige Dextranlösung werden mit 33 ml 32, 8%-iger Ronpcaon-Lösung vermischt, Es ergeben sich 100 ml Sedimentierflüssigkeit. Die Dichte soll nun 1, 07 - 1, 08 g/ml betragen.
4. Zum Abschluß wird die Lösung durch einen bakterienundurchlässigen Mikroporenfilter sterilfiltriert. Bis zur Verwendung wird die Lösung im Kühlschrank bei 4^{o} C aufbewahrt.

Sterile Röhrchen wie bei a) .
Sterile Kunststoffpipetten (BECTON, DICKINSON GmbH, Best. Nr. 7529).

c) Waschen der angereicherten Leukozyten :

Herstellung des Phosphat-Citrat-Albumin-Puffers:

3, 2 g $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$
7, 2 g KH_2PO_4
14, 7 g Natriumcitrat
4, 0 g Serumalbumin vom Rind

werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, sterilisiert und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.
Kulturmedium : RPMI Medium with L-Glutamine (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA).

3, 6 %ige sterile Kochsalzlösung.
0, 9 %ige sterile Kochsalzlösung.

d) Inkubation der angereicherten Leukozyten :

Kulturmedium wie bei c).
Endotoxin : Salmonella enteritidis endotoxin, Lipopolysaccharide B. (Difco Lab., Detroit, USA).
Das Endotoxin wird in gefriergetrocknetem Zustand, in 100 mg Portionen geliefert. Zur Inkubation wird das Endotoxin in einer Konzentration von 10 ug / ml Kulturmedium verwendet.

Sterile Gewebekulturflaschen aus Kunststoff, 50 ml. (Fa. BECTON, DICKINSON GmbH).

Trypanblau-Lösung, 0,25 % (Fa. Bayer).

3. Ergebnisse

3.1 Rekalzifizierungszeit

Die Zugabe von Leukozytenhomogenat zum Testansatz der aktivierten Rekalzifizierungszeit führte im Vergleich zum Kontrollansatz mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu einer konzentrationsabhängigen starken Verkürzung der gemessenen Gerinnungszeiten. Deutliche Unterschiede ergaben sich dabei zwischen den nur im Kulturmedium inkubierten Leukozyten und den zusätzlich mit Endotoxin stimulierten Leukozyten. (Tab. 1, Abb. 3).

Leukoz. / mm^3	x_i (Sek.)				$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$
20 000	27,2	26,5	27,5	26,8	27,0	0,4
10 000	28,8	29,5	28,5	29,5	29,1	0,5
5 000	31,1	32,1	30,6	32,0	29,1	0,9
2 500	33,5	34,0	34,0	32,0	33,4	1,0
1 250	36,6	37,7	37,3	37,3	37,2	0,5
625	39,8	41,0	39,4	39,0	38,3	1,9
NaCl-Kontr.	49,8	50,0	49,5	50,0	49,8	0,3

a) Rekalzifizierungszeit mit Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Leukoz. / mm^3	x_i (Sek.)				$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$
20 000	34,7	37,5	36,7	36,6	36,4	1,2
10 000	37,8	39,0	39,0	38,4	38,6	0,6
5 000	40,1	40,2	41,5	-	40,9	0,3
2 500	43,9	43,3	42,8	43,9	43,5	0,5
1 250	44,0	44,2	43,8	44,5	44,1	0,3
625	44,8	45,2	44,6	45,3	45,0	0,3
NaCl-Kontr.	- s. oben				49,8	0,3

b) Rekalzifizierungszeit mit nicht-Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Tab. 1

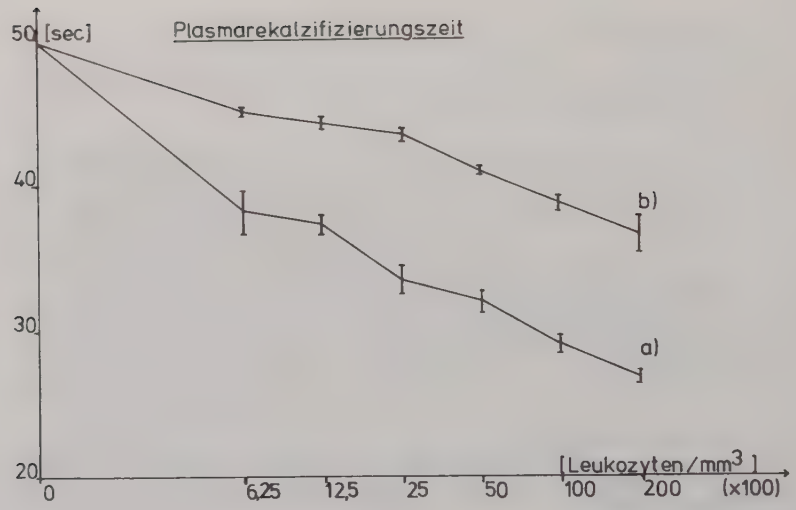


Abb. 3 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

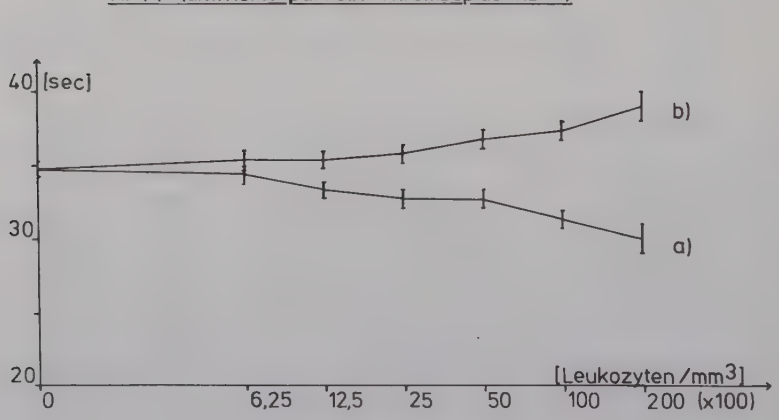


Abb. 4 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

3.2. Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (APTT)

Wie man aus Abb. 4 erkennt, führt der Zusatz von kultivierten Leukozyten zu keiner Gerinnungsbeschleunigung, während die Endotoxin-stimulierten Leukozyten zu einer geringen Gerinnungsbeschleunigung führten. (s. Tab. 2)

Leukoz. / mm^3	x_i (Sek.)				$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$
20 000	30,0	31,0	29,0		30,0	1,0
10 000	31,0	31,0	32,0		31,3	0,6
5 000	33,0	33,0	32,0		32,7	0,6
2 500	33,0	32,0	33,0		32,7	0,6
1 250	33,0	33,0	34,0		33,3	0,6
625	34,0	35,0	34,0		34,3	0,6
NaCl-Kontr.	35,0	35,0	35,0	34,0	34,75	0,5

a) APTT mit Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Leukoz. / mm^3	x_i (Sek.)			$\bar{x}$	$\pm s_{\bar{x}}$
20 000	39,0	40,0	38,0	39,0	1,0
10 000	37,0	38,0	37,0	37,3	0,6
5 000	37,0	36,0	37,0	36,7	0,6
2 500	35,0	36,0	36,0	35,7	0,6
1 250	35,0	35,0	36,0	35,3	0,6
NaCl-Kontr.	s. oben			34,75	0,5

b) APTT mit nicht Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Tab. 2

3.3. Thrombelastographie

Bei der Thrombelastographie führten Endotoxin-stimulierte Leukozyten im Vergleich zur Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer deutlichen Verkürzung der Reaktionszeit (r) und der Gerinnselbildungszeit (k). Die maximale Amplitude (m_a) und die maximale Thrombuselastizität waren deutlich höher (s. Tab. 3a, Abb. 6a). Die ohne Endotoxin inkubierten Leukozyten bewirkten dieselben Veränderungen der Parameter im TEG, wenn auch in geringerem Ausmaß (s. Tab. 3b, Abb. 6b).

Leukoz. / mm^3	r	k	m_a(mm)	m_E
20 000	2′	1′45″	65	186
5 000	4′	2′30″	64	178
1 250	7′	3′30″	60	150
NaCl-Kontr.	14′	8′15	38,5	63

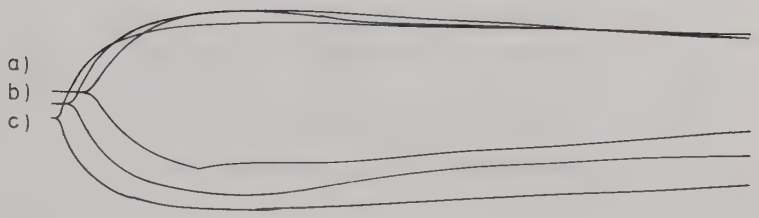
a) TEG mit Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Leukoz. / mm^3				
20 000	3′30″	1′45″	67	203
5 000	7′	2′30″	62	163
1 250	10′30″	6′	56	127
NaCl-Kontr.	14′	8′15″	38,5	63

b) TEG mit nicht Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Tab. 3

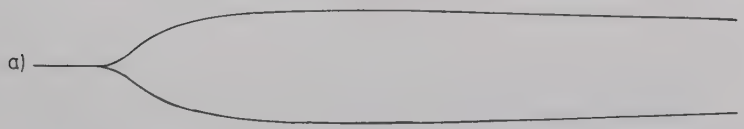
TEG mit Endotoxin-inkubierten Leukozyten



a) 1250 Leukozyten/mm^3
b) 5000 „
c) 20000 „

Abb. 6a

TEG mit nicht Endotoxin inkubierten Leukozyten



a) NaCl-Kontrolle

b) 1250 Leukozyten/mm^3
c) 5000 „
d) 20000 „

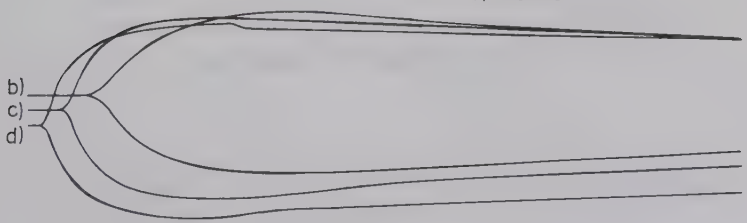


Abb. 6b

3.4. Prothrombinverbrauchstest

Die Endotoxin-stimulierten Leukozyten bewirkten im Testansatz einen hohen Prothrombinverbrauch, erkennbar an den verlängerten Gerinnungszeiten bei hohen Leukozytenkonzentrationen. Im Vergleich dazu führten Leukozyten, die nicht mit Endotoxin inkubiert wurden zu einem geringen Prothrombinverbrauch (s. Tab. 4).

Leukoz. / mm^3			
20 000	105,3	108,3	106,8
5 000	31,3	31,7	31,5
NaCl-Kontr.	11,1	10,9	11,0

a) Mit Endotoxin stimulierten Leukozyten

Leukoz. / mm^3			
20 000	23,5	23,8	23,7
5 000	11,1	10,6	10,9
NaC -Kontr.	11,1	10,9	11,0

b) nicht Endotoxin-stimulierte Leukozyten

Tab. 4

3.5. Prothrombinzeit nach QUICK

Die Prothrombinzeit ließ sich weder durch Endotoxin aktivierte, noch durch Leukozyten, die ohne Endotoxin inkubiert worden waren, verkürzen. Es trat im Gegenteil eine Verlängerung der Gerinnungszeiten ein. (Tab. 5)

Leukoz. / mm^3	x_i (Sek.)		$\bar{x}$
20 000	20,7	19,5	20,1
5 000	19,2	18,8	19,0
1 250	17,5	16,5	17,0
NaCl-Kontr.	15,8	16,2	16,0

a) mit Endotoxin inkubierten Leukozyten

Leukoz. / mm^3	x_i (Sek.)		$\bar{x}$
20 000	21,8	22,3	22,1
5 000	20,4	20,6	20,5
1 250	18,5	19,1	18,8
NaCl-Kontr.	15,8	16,2	16,0

b) mit nicht Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Tab. 5

3.6. Zweistufentest nach NEMERSON

Beim Zweistufentest bewirken Endotoxin stimulierte Leukozyten eine Verkürzung der Gerinnungszeiten, was auf ihre Gewebsthromboplastin-Aktivität hindeutet. Leukozyten, die nicht mit Endotoxin inkubiert wurden, verkürzten die Gerinnungszeiten ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß (Tab. 6, Abb. 7).

Leukoz. /mm^3	x_i (Sek.)				$\bar{x}$	$\pm s_x$
20 000	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	0
10 000	29,0	32,0	30,0	32,0	30,8	1,1
5 000	46,0	51,0	53,0	53,0	50,8	3,1
1 250	54,0	54,0	55,0	57,0	55,3	1,3
625	59,0	56,0	55,0	55,0	56,3	1,9
NaCl-Kontr.	85,0	82,0	84,0	-	83,7	1,5

a) Zweistufentest mit Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Leukoz. /mm^3	x_i (Sek.)				$\bar{x}$	$\pm s_x$
20 000	43,0	40,0	44,0	41,0	42,0	1,8
10 000	57,0	56,0	57,0	56,0	56,5	0,6
5 000	64,0	62,0	65,0	63,0	63,5	1,3
1 250	77,0	72,0	72,0	72,0	73,3	2,5
625	80,0	79,0	78,0	-	79,0	1,0
NaCl-Kontr.	s. oben				83,7	1,5

b) mit nicht Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Tab. 6

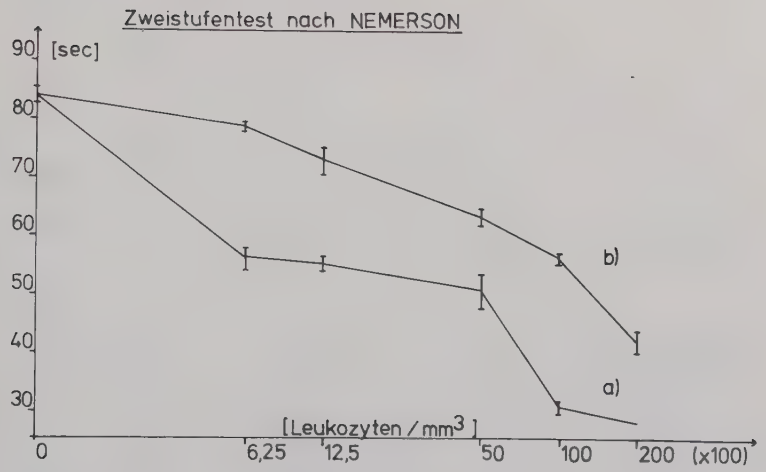


Abb. 7 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

3.7. Untersuchungen mit Mangelplasmen

Die untersuchten Mangelplasmen wurden von den Leukozyten in unterschiedlicher Weise beeinflußt. So verkürzten sich unter dem Einfluß der Endotoxin-stimulierten Leukozyten die Gerinnungszeiten der Faktor-V-, -VIII-, -IX-, -XI- und -XII-Mangelplasmen. Dagegen wurde die Gerinnungszeit von Faktor-VII/X-Mangelplasma nicht beeinflußt. Tab. 7 zeigt eine zusammenfassende Übersicht der Untersuchungsergebnisse. (s. auch Abb. 8 - 12).

Leukoz./mm^3	V	VII/X	VIII	IX	XI	XII (Sek.)
20 000	140	600	35,0	38,5	27	35,5
10 000	178	-	41,0	42,5	47	42,5
5 000	216	-	47,8	47,5	50	48,0
2 500	-	-	52,7	54,5	-	-
1 250	433	-	56,3	57,5	90	68,5
625	-	-	65,8	64,5	-	-
NaCl-Kontr.	600	600	169,4	103,8	600	180,0

a) mit Endotoxin-stimulierten Leukozyten

Leukoz./mm^3	V	VII/X	VIII	IX	XI	XII (Sek.)
20 000	175	600	64,0	57,0	73	66,5
10 000	187	-	71,5	67,3	75	75,5
5 000	254	-	85,5	72,6	74	89,5
2 500	-	-	-	84,0	-	-
1 250	438	-	103,0	87,8	132	129,5
625	-	-	-	94,0	-	-
NaCl-Kontr.	600	600	169,4	103,8	600	180,0

b) mit nicht Endotoxin inkubierten Leukozyten

Tab. 7 (Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte von 2 - 3 Bestimmungen)

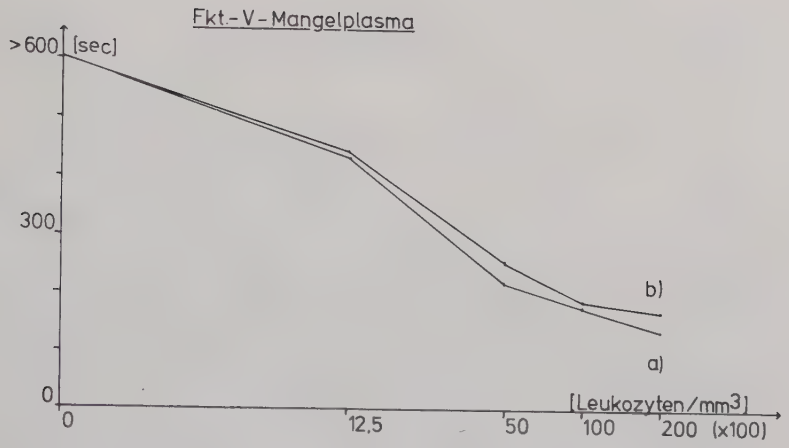


Abb. 8 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

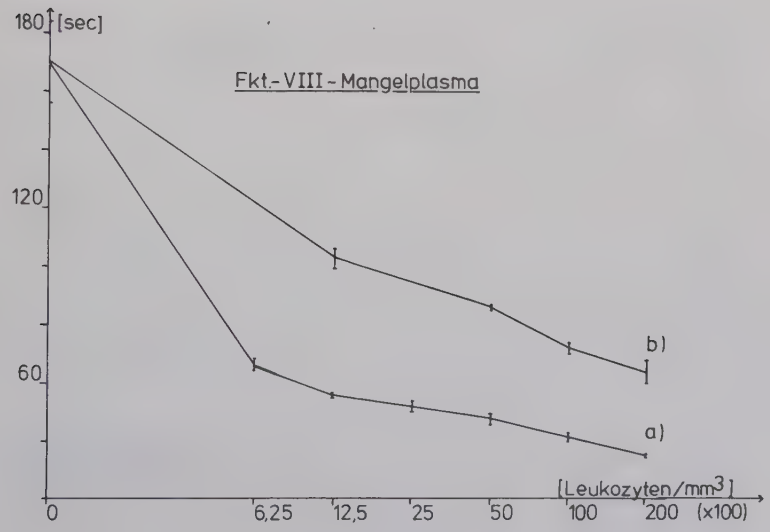


Abb. 9 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

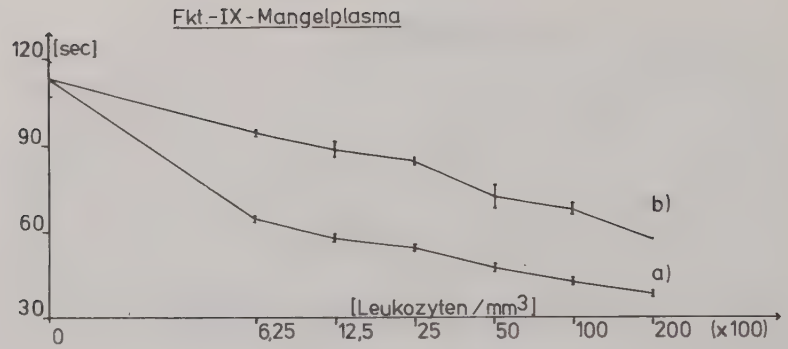


Abb. 10 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

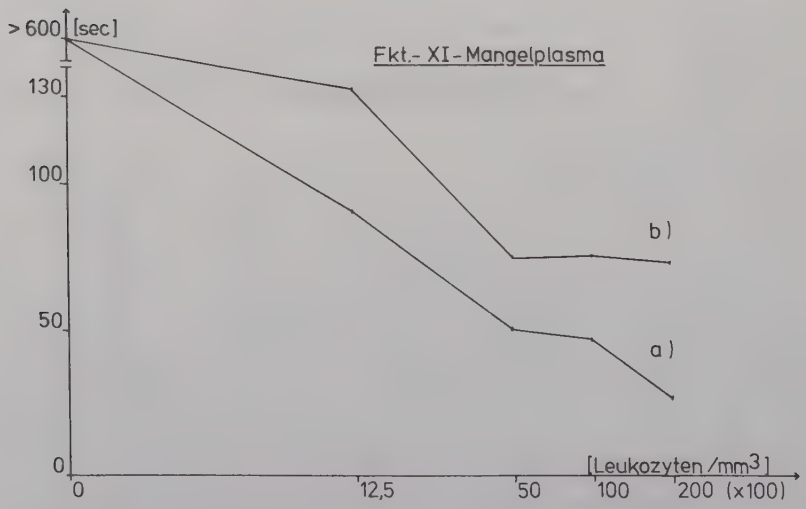


Abb. 11 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

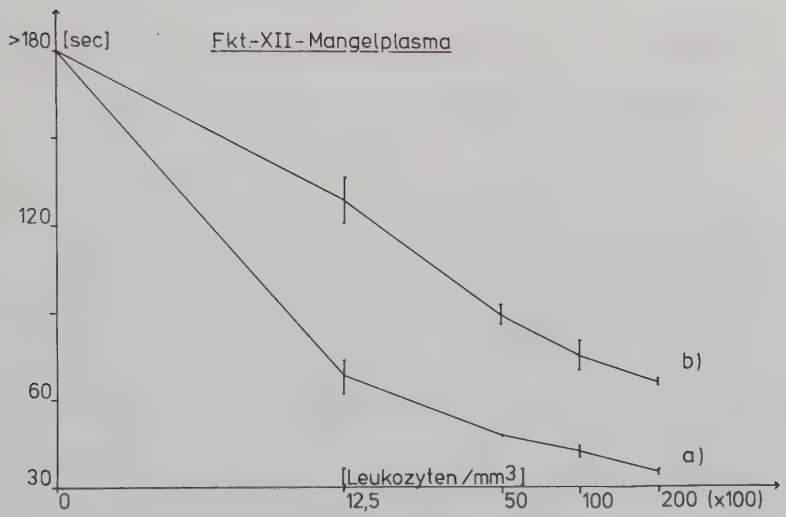


Abb. 12 a) mit Endotoxin b) ohne Endotoxin

4. Diskussion

Voruntersuchungen zu dieser Arbeit wie auch Untersuchungen anderer Autoren (HILLER et al., 1976; LERNER et al., 1971) hatten ergeben, daß Homogenate gemischter Leukozyten die plasmatischen Gerinnungssysteme in unterschiedlicher Art und Weise beeinflußten. Meist ging dabei von den Leukozyten eine Hemmung aus, wenngleich auch bei einigen Versuchen eine gerinnungsbeschleunigende Aktivität zum Nachweis kam. Da andere Arbeitsgruppen (NIEMETZ und FANI, 1971;NIEMETZ, 1971; NIEMETZ, 1972) beobachteten, daß Leukozyten von mit Endotoxin vorbehandelten Kaninchen eine wesentlich stärkere gerinnungsfördernde Wirkung als Leukozyten von unbehandelten Kaninchen besitzen, wurden in eigenen Untersuchungen in einem Kulturmedium inkubierten menschlichen Leukozyten Endotoxin von Salmonella enteritidis zugesetzt.

Dadurch kam es, wie in den Ergebnissen gezeigt wurde, zu einem gegenüber den Kontrollansätzen und den nicht stimulierten Leukozyten ganz erheblichen Anstieg der gerinnungsfördernden Aktivität. Auch die alleinige Inkubation der Leukozyten in einem Kulturmedium ohne Endotoxin führte, wie auch von LERNER (1971) gezeigt wurde, zu einer allerdings weniger starken Zunahme der gerinnungsfördernden Aktivität.

In den zur Anwendung kommenden Gerinnungstestsystemen wurden durch die Beimischung von Leukozytenhomogenaten besonders die Rekalzifizierungszeit, das Thrombelastogramm,der Prothrombinverbrauchstest, der Zweistufentest nach NEMERSON (1966) und die Einstufentests mit Faktor-VIII- , -IX-, -XI- und -XII-Mangelplasma beeinflußt. Eine geringe Beeinflussung erfuhren die

aktivierte partielle Thromboplastinzeit und der Einstufentest mit Faktor-V-Mangelplasma. Hingegen blieb nach Zugabe von Leukozytenhomogenaten im Einstufentest das Faktor-VII/X - Mangelplasma völlig ungerinnbar.

Diese Ergebnisse lassen folgende Deutung zu : Da es möglich war, durch Zugabe von Leukozytenhomogenaten das Fehlen der Gerinnungsfaktoren des "intrinsic system" auszugleichen, kann angenommen werden, daß die gerinnungsfördernde Aktivität der Leukozyten über das "extrinsic system" wirksam wird, sofern die Leukozyten nicht selbst Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren besitzen. Dies wurde aber durch Untersuchungen von FORTY-NOVA und POSPISLOVA (1964) ausgeschlossen. Es kann jedoch keine Verkürzung der Gerinnungszeiten erzielt werden, wenn die für das "extrinsic system" erforderlichen Faktoren VII und X fehlen.

Dieses unterschiedliche Verhalten in den Einstufentests mit Faktoren-Mangelplasmen wäre ein Hinweis, daß es sich bei der aus den Leukozyten freigesetzten gerinnungsbeschleunigenden Aktivität um eine mit dem Gewebsthromboplastin identische Substanz handelt.

Der Zweistufentest nach NEMERSON (1966), ein Test, mit dessen Hilfe Gewebsthromboplastin spezifisch nachweisbar ist, deutet ebenfalls auf den Gewebstromboplastingehalt der untersuchten Leukozyten hin. Es bleibt zu fragen, wie und wann eine gerinnungsfördernde Aktivität in Leukozyten nach Inkubation im Kulturmedium und besonders nach zusätzlicher Stimulation mit Endotoxin entsteht.

Man nimmt an, daß Endotoxin neben der Stimulation der Stoffwechselleistung und der Phagozytosetätigkeit der Leukozyten (CLINE et al., 1968) die Freisetzung einer dem Gewebsthromboplastin in seiner Wirkung ähnlichen gerinnungsaktiven Substanz aus den Lysosomen der Leukozyten bewirkt (LERNER et al., 1971). Die Tatsache, daß Leukozyten, die nur in einem Kulturmedium ohne Endotoxin inkubiert wurden, ebenfalls eine wenn auch schwächere gerinnungsfördernde Wirkung besitzen, kann mit einiger Wahrscheinlichkeit auf die mechanische und osmotische Belastung der Leukozyten während des Anreicherungsvorganges zurückgeführt werden.

Untersuchungen über die Beeinflussung der Blutgerinnung durch Endotoxin-stimulierte Leukozyten gewinnen klinische Bedeutung, wenn man bedenkt, daß die mit dem Endotoxinschock einhergehende disseminierte intravasale Gerinnung möglicherweise zum Teil durch freiwerdendes Gewebsthromboplastin aus Leukozyten mitverursacht wird.

Tierexperimentelle Untersuchungen zum Shartzmann-Sanarelli-Syndrom (LERNER et al., 1968; McKAY et al., 1967; MÜLLER-BERGHAUS und ECKHARDT, 1975; MÜLLER-BERGHAUS et al., 1976) zeigten, daß es nach zwei aufeinander folgenden Endotoxininjektionen bei Versuchstieren zu einer intravasalen Gerinnung mit Thrombenbildung in den Kapillarschlingen der Glomerula und zu Nierenrinden-Nekrosen kommt. Wurden dagegen die Versuchstiere mit geeigneten Mitteln, wie z.B. Stickstofflost (HN_2) leukopenisch gemacht, konnte die normalerweise auftretende intravasale Gerinnung verhindert werden.

Als Parameter für die intravasale Gerinnung wurde das Verhalten der Thrombozytenkonzentrationen und der Aktivität verschiedener Gerinnungsfaktoren gemessen.

Da die leukopenisch gemachten Versuchstiere nach den Endotoxininjektionen keine disseminierte intravasale Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie entwickelten, kann geschlossen werden, daß die Leukozyten am Zustandekommen dieses Krankheitsbildes wesentlich beteiligt sind.

Umgekehrt kommt es bei leukopenisch gemachten und mit Endotoxin vorbehandelten Versuchstieren nach Transfusion von Leukozyten wieder zur disseminierten intravasalen Gerinnung (MÜLLER-BERGHAUS et al., 1976).

Die eigenen Untersuchungen wie auch die meisten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Frage der gerinnungsfördernden Aktivität weißer Blutzellen wurden mit gemischten Leukozyten durchgeführt. Es wurde bislang angenommen, daß die gerinnungsfördernde Aktivität der Leukozyten von den Granulozyten ausging (HORN und COLLINS, 1968; KOCIBA et al., 1972; LERNER et al., 1968).

Jedoch deuten jüngere Untersuchungen darauf hin, daß nicht Granulozyten, sondern Monozyten für die gerinnungsbeschleunigende Wirkung verantwortlich sind (RIVERS und HATHAWAY, 1975; HILLER et al., 1977).

5. Zusammenfassung

Aus Zitratblut von 20 gesunden Spendern wurden mit einer Sedimentationsmethode die Leukozyten isoliert, gewaschen und in einem Kulturmedium über 20 Stunden inkubiert. Der Hälfte der Zellen wurde Endotoxin von Salmonella enteritidis ins Kulturmedium zugesetzt. Nach Inkubation wurden alle Leukozyten zu je einem Pool mit und ohne Endotoxin zusammengefaßt.

Die gemischten Leukozyten wurden mit Ultraschall desintegriert und in verschiedenen in vitro Testsystemen eingesetzt. Die Lysate von Endotoxin-stimulierten Leukozyten führten zu einer deutlichen Verkürzung der Rekalzifizierungszeit von Normalplasma. Es verkürzten sich ebenfalls die Gerinnungszeiten von Faktor-V-, -VIII-, -IX-, -XI- und -XII-Mangelplasma. Dagegen ergab sich keine Verkürzung der Gerinnungszeit von Faktor-VII/X-Mangelplasma. Im TEG, im Prothrombinverbrauchstest und in der APTT zeigte sich ebenfalls die gerinnungsbeschleunigende Wirkung der inkubierten Leukozyten. Auch die nicht Endotoxin-stimulierten Leukozyten führten zu einer allerdings geringeren Aktivierung der plasmatischen Gerinnungstests.

In einem für den Nachweis von Gewebsthromboplastin spezifischen Zweistufentest konnte gezeigt werden, daß mit und ohne Endotoxin inkubierte Leukozyten einen dem Gewebsthromboplastin in seiner Wirkung ähnlichen Stoff enthalten. Dies steht auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Untersuchungen mit Mangelplasmen.

Wahrscheinlich bewirkt Endotoxin eine Freisetzung von Gewebsthromboplastin aus den Lysosomen der Leukozyten und löst somit eine Aktivierung des "extrinsic system" der Blutgerinnung aus.

6. Literatur

ASTRUP, T., J. HEINRICHSON and H. C. KWAAN :
Protease Content and Fibrinolytic Activity of Human Leukocytes.
Blood 29, 134 - 138 (1967)

BØYUM, A.:
Separation of Leukocytes from Blood and Bone Marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, suppl. 97 (1968)

BØYUM, A. :
Separation of White Blood Cells.
Nature 204 : 793 (1964)

CLINE, M. J., K. L. MELMON, W. C. DAVIS and H. E. WILLIAMS :
Mechanism of Endotoxin Interaction with Human Leukocytes.
Brit. J. Haemat. 15 : 539-547 (1968)

FORTYNOVA, J. and V. POSPISLOVA :
Untersuchungen der plasmatischen Atmorphäre der Leukozyten im Hinblick auf das Vorhandensein von Gerinnungsfaktoren.
Folia Hämatol. 82 : 220 - 237 (1964)

GANS, H. :
Fibrinolytic Properties of Proteases Derived from Human Dog and Rabbit Leukocytes.
Thromb. Diath. Haemorrh. 10 : 379 - 389 (1963)

GARG, S.K. and J. NIEMETZ :
Tissue Factor Activity of Normal and Leukemic cells.
Blood 42 : 729 - 735 (1973)

HILLER, E., H.-J. SCHMID, P. OSTENDORF and G.W.GRIFFITHS :
Der Einfluß von Endotoxin auf die Gerinnungsaktivität von Leukozyten.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 82 : 1362 - 1365 (1976)

HILLER, E., J.G.SAAL, P. OSTENDORF and G.W.GRIFFITHS :
The Procoagulant Activity of Human Granulocytes, Lymphocytes and Monocytes Stimulated by Endotoxin.
Klin. Wschr. 55 : 751 - 757 (1977)

HORN, R.G. and R.D. COLLINS :
Studies on the Pathogenesis of the Generalized Shwartzman Reaction.
Lab. Invest. 18 : 101 - 107 (1968)

KOCIBA, G.J., LOEB, W.F. and R.L.WALL :
Development of Procoagulant Activity (Tissue Thromboplastin) in Cultured Leukocytes.
J. Lab. ClinMed. 79 : 778 - 787 (1972)

KOCIBA, G.J. and R.A.GRIESEMER :
Disseminated Intravascular Coagulation Induced with Leukocyte Procoagulant.
Am. J. Pathol. 69: 407 - 416 (1972)

LERNER, R.G., S.I. RAPAPORT and J.M. SPITZER :
Endotoxin-Induced Intravascular Clotting : The Need for Granulocytes.
Thromb. Diath. Haemorrh. 20 : 430 - 443 (1968)

LERNER, R.G., R. GOLDSTEIN and G. CUMMINGS :
Stimulation of Human Leukocyte Thromboplastic Activity by Endotoxin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138 : 145 - 148 (1971)

LISIEWICZ, J., A. PITUCH and J. A. LITWIN :
The Local Sanarelli-Shwartzman Phenomenon in Rats Induced by Human Leukemic Cells.
Thromb. Diath. Haemorrh. 29 : 353 - 362 (1973)

MARTIN, M. und L. ROKA :
Beeinflussung der Blutgerinnung durch Leukozyten.
Klin. Wschr. 29: 510-512 (1951)

McKAY, D.G., W. MARGARETTEN and L. L. PHILLIPS:
The Role of the Leukocyte in the Generalized Shwartzman Reaction.
Lab. Invest. 16 : 511 - 515 (1967)

MÜLLER-BERGHAUS, G. and T. ECKHARDT :
The Role of Granulocytes in the Activation of Intravascular Precipitation of Soluble Fibrin by Endotoxin.
Blood 45 : 631 - 641 (1945)

MÜLLER-BERGHAUS, G., E. BOHN and W. HÖBEL :
Activation of Intravascular Coagulation by Endotoxin : The Significance of Granulocytes and Platelets.
Br. J. Haematol. 33 : 213 - 220 (1976)

NEMERSON, Y. :
The Reaction between Bovine Brain Tissue Factor and Factors VII and X.
Biochemistry 5 : 601 - 608 (1966)

NEMERSON, Y. :
The Phospholipid Requirement of Tissue Factor in Blood Coagulation.
J.Clin.Invest. 47 : 72 - 80 (1968)

NIEMETZ, J. and K. FANI :
Role of Leukocytes in Blood Coagulation and the Generalized Shwartzman Reaction.
Nature 232 : 247 - 248 (1971)

NIEMETZ, J. :
The Role of Protein Synthesis on the Generation of Tissue Factor Activity by Leukocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139 : 1276 - 1279 (1971)

NIEMETZ, J. :
Coagulant Activity of Leukocytes / Tissue Factor Activity.
J. Clin Invest. 51 : 307 - 313 (1972)

NIEMETZ, J. and K. FANI :
Thrombogenic Activity of Leukocytes.
Blood 42 : 47 - 59 (1973)

RAPAPORT, S.I. and P.F. HJORT :
The Blood Clotting Properties of Rabbit Peritoneal Leukocytes in vitro.
Thromb. Diath. Haemorrh. 17 : 222 - 236 (1976)

RIVERS, R. P. A., W. E. HATHAWAY and W. L. WESTON:
The Endotoxin-Induced Coagulant Activity of Human Monocytes.
Br. J. Haematol. 30 : 311 - 316 (1975)

SABA, H. I., J. C. HERION, R. I. WALKER and
H. R. ROBERTS :
The Procoagulant Activity of Granulocytes.
Soc. Exp. Biol. Med. 42, 614 - 620 (1973)

SZPILMAN, H., J. PROKOPOWICZ and S. NIEWIAROWSKI:
Distribution of Procoagulant Activity in the Subcellular Fractions of Human Granulocytes.
Experientia 25 : 77 - 78 (1969)

ZACHARSKI, L. R. and O. R. McINTYRE :
Tissue Factor (Thromboplastin, Factor III) Synthesis by Cultured Cells.
J. Med. 4 : 118 - 131 (1973)

Lebenslauf

Am 23. Oktober 1949 wurde ich, Hans-Joachim Schmid, als Sohn des Hans Schmid und der Eva-Maria Schmid-Rehdorf in Tübingen geboren.
Nach vierjähriger Grundschulzeit trat ich 1960 in das Tübinger Uhlandgymnasium ein. 1965 wechselte ich an die Tübinger Freie Waldorfschule über, wo ich 1970 die Reifeprüfung ablegte.
Im Sommersemester 1971 erlangte ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Universität Hohenheim. Nach dem Vorphysikum am 16.3.1972 wechselte ich an die Eberhard-Karls-Universität in Tübingen über, wo ich am 23.9.1973 die Ärztliche Vorprüfung bestand. Mit dem Staatsexamen schloß ich am 21.12.1976 mein Medizinstudium ab.
Vom 1. Febr. 1977 bis 31. Jan. 1978 leistete ich meine Medizinalassistentenzeit an den verschiedenen Abteilungen des Städtischen Krankenhauses in Villingen ab. Im Anschluß daran erhielt ich meine Approbation als Arzt.